

Title	Computer-aided design of anti-HIV molecules
Author(s)	田, 雨時
Citation	
Issue Date	
oaire:version	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/59409">https://hdl.handle.net/11094/59409</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed</a> 大阪大学の博士論文について <a href="#">ご参照</a> ください。

*Osaka University Knowledge Archive : OUKA*

<https://ir.library.osaka-u.ac.jp/>

Osaka University

【21】

氏 名	デン 田	ウ 雨	シ 時
博士の専攻分野の名称	博 士（薬学）		
学 位 記 番 号	第 2 5 1 8 0 号		
学 位 授 与 年 月 日	平成 24 年 3 月 22 日		
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科生命情報環境科学専攻		
学 位 論 文 名	Computer-aided design of anti-HIV molecules (計算機支援の抗 HIV 分子デザイン)		
論 文 審 査 委 員	(主査) 教 授 高木 達也 (副査) 教 授 生田 和良 教 授 大久保忠恭 教 授 小比賀 聡		

論 文 内 容 の 要 旨

ヒト免疫不全ウイルス (Human immunodeficiency virus, HIV) は後天性免疫不全症候群 (Acquired immune deficiency syndrome, AIDS) の原因ウイルスであり, 2010 年末の時点で, 世界中でおよそ 3400

万人が HIV に感染している. 1996 年以降, 多剤併用抗レトロウイルス療法の導入により, 欧米諸国における本感染症の死亡率は激減し, 致死的な疾患から慢性疾患になったとまで言われるようになった. しかし, HIV の高変異率による薬剤耐性は HIV/AIDS 治療を妨げる重要な問題の一つである. それゆえ, 臨床現場においては耐性ウイルスの出現に注意を払いながら患者の治療を行っている. また, 病態の慢性化に伴い, 長期間に渡る薬剤の組み合わせ投与は患者に様々な副作用をもたらす. したがって, 副作用が少なくより効果的な新薬の登場が求められている. そのような背景の下, 申請者はより効果的な抗HIV薬の創出を目指し, *in Silico* による薬剤開発 (計算機支援による薬剤開発) を試みた.

本研究では 2 つの HIV 治療ターゲットに注目した. 第一ターゲットはウイルスが宿主細胞へ侵入するために必須となるウイルス膜と宿主細胞膜との融合過程において, 極めて重要な役割を果たす糖タンパク質 glycoprotein 41 (gp41) である. gp41 はホモ三量体を形成し, 各ユニットには膜融合に重要な役割を果たす二つの  $\alpha$ -helical heptad repeats (HRs) N-HR と C-HR が存在する. ウイルス侵入時, gp41 と gp120 複合体の会合により形成される三量体の複合体スパイクが宿主細胞の CD4 およびケモカインレセプターと結合した後, gp41 先端にある fusion peptide が宿主細胞膜に挿入される. これによって, 大きな構造変化が起こり, 3 本の N-HR と逆平行の 3 本の C-HR から 6 量体ヘリックスバンドル (6 helix bundle, 6HB) 構造が形成され, これが膜融合の引き金となる. それゆえ, この構造の形成を妨げることによって, この膜融合過程を阻害できる. 第二ターゲットは多数の細胞に存在する分子シャペロンタンパク質 Cyclophilin A (CypA) である. HIV のキャプシドタンパクが CypA の活性サイトと結合することにより, ウイルスキャプシドの崩壊が促進され, ウイルスの感染効率に影響する. それゆえ, この CypA 活性サイトに吸着する分子は新規 HIV の阻害剤候補になると期待できる. そこで, 申請者はこれら二つの蛋白質を対象に, *in Silico* 手法を用いた阻害剤探索を試みた.

申請者はまず HIV 膜融合阻害剤の開発を試みた. C-HR 様ペプチド C34 及びその改良体は 6HB の形成を阻害し, 抗ウイルス活性を示すことが報告されている. しかし, これまでの取組みは特定の HIV gp41 の C-HR 配列に基づいたものであり, HIV 配列データベースのデータを活用したものではなかった. そこで, 申請者は *in Silico* によるより優れた人工ペプチドの創出を目標として, Los Alamos HIV 配列データベースから大量の配列を抽出し, これらの 34 残基ペプチドのポテンシャルエネルギーと抗 HIV 活性の関係を検討することにより, 阻害剤の候補となりうるペプチド探索を行った. 次に, これらのペプチドの実際抗ウイルス効果の測定を共同研究者による実験で評価した. さらに, より強力な活性を有するペプチドを創出するため, 実験結果及び分子モデリングから得られた情報をもとに, ペプチド配列のさらなる改良を試みた.

具体的には, P. Isarangkura [1] ら報告した 6 本のペプチドをモデリングし, それぞれのポテンシャルエネルギーを計算した. その計算結果とそれらを投与時のウイルスの合胞体形成能の実験データ [1] と照合し, 「安定なポテンシャルエネルギーを有するペプチドが強力なウイルス阻害能を有する」という仮説を立てた. この仮説に基づき, Los Alamos HIV 配列データベース中の全てのサブタイプ B, CRF01\_AE, CRF02\_AG の gp41 配列データを入手して, それらの C-HR 34 残基ペプチドのモデリングを行い, ポテンシャルエネルギーを評価した. その結果をもとに, 7 本のペプチド配列を抽出・購入し, 実際の抗 HIV 活性を測定したところ, そのうち 3 本は野生型の C34 より強力なウイルス複製阻害効果を認めた. さらに, これらペプチドの活性増強と溶解性改善のため, 配列の改良を施した 11 本の新規ペプチドをデザインした. そのうちの 3 本は広範な抗 HIV スペクトルを有すると同時に, 膜融合阻害剤 T-20 の耐性ウイルスにも有効であった. これまで, C-HR 模倣ペプチドの修飾は主に

溶媒接触側残基中心に行われていたが、N-HR との相互作用面に位置する残基の修飾を行っても、ペプチドの活性増強に寄与する可能性があることを本研究で示すことができた。

引き続き、申請者は CypA をターゲットとする低分子化合物を見出すために、近年ドラッグデザインにおいてよく用いられる方法の一つである分子ドッキング法を用いて候補化合物の探索を行った。具体的には、CypA の表面にあるリガンド結合部位に市販化合物データベース中のリガンドを配置し、London dG というスコア関数を用いてそれらの親和性を評価した。実際のスクリーニングを行うに先立ち、CypA とジペプチド Ala-Pro (AP) の共結晶構造を用いてドッキングによる結晶構造の再現を試みた。その結果、パラメータをデフォルトに設定してドッキングを行っても、リガンドである AP は結晶構造とほぼ同位置に配置されることを確認できた。続いて、同様のパラメータを用いて、1377 個からなる低分子化合物の商用データベースをドッキングした後、親和性が高いと評価された上位約 2% の 31 化合物を有力な阻害剤候補として選出した。ここから、市販の 29 化合物及びコントロール化合物 2 種について、抗 HIV 活性の測定を共同研究者に依頼した。その結果、2 種類の化合物はコントロール化合物と比べ、より強力な HIV 複製抑制活性を示した。また、これらの分子はウイルス増殖を 50% 阻害する濃度において、比較的低い細胞毒性を有することが確認できた。本研究で申請者が報告した 2 種の化合物は既存の CypA 阻害剤と異なる骨格を有するため、CypA 阻害剤の新たなリード化合物として今後期待できると考えられる。特に、その中の 1 つは強力な阻害活性を示すと同時に、既存の阻害剤と異なる結合様式を有するため、新系列の CypA 阻害剤開発に繋がる有用な情報を提示することができた。

申請者は gp41 6HB と CypA の 2 ターゲットに対して、より強力な阻害活性を有する新規分子を *in Silico* 手法により見出した。また、本研究の過程で、ターゲット親和性を向上させるための新たな配列修飾の方向性や、新たな結合様式を有する化合物を見出した。本研究により得られたこれらの情報は、次世代の HIV 阻害剤の開発に有用な情報を提供したと考えられる。最終的に、本情報が世界中の HIV 感染及び AIDS の持続的な減少の一助になれば、申請者にとって幸いの極まりである。

## Reference

- [1] N.A., P.I.; Li, G.M.; Warachit, J.; Iwabu, Y.; Tsuji, S.; Auwanit, W.; Yamamoto, D.; Goto, T.; Hayashi, Y.; Kiso, Y.; Ikuta, K.; Different susceptibility of human immunodeficiency virus type 1 to Env gp41-derived synthetic peptides corresponding to the C-terminal heptad repeat region. *Microbes Infect.* **2005**, 7, 356–364.

## 論文審査の結果の要旨

ヒト免疫不全ウイルス (HIV) は後天性免疫不全症候群 (AIDS) の原因ウイルスであるが、1996 年以降、多剤併用抗レトロウイルス療法を導入により、欧米諸国における本感染症の死亡率は激減し、致死的な疾患から慢性疾患になったとまで言われるようになった。しかし、HIV の高変異率による薬剤耐性は HIV/AIDS 治療を妨げる重要な問題の一つである。それゆえ、臨床現場においては効果的な新薬の登場が求められている。そのような背景の下、申請者はより効果的な抗 HIV 薬の創出を目指し、SBDD (Structure-Based Drug Design) を試みた。

本研究では 2 つの HIV 治療ターゲットに注目した。第一ターゲットはウイルスが宿主細胞へ侵入するために必須となるウイルス膜と宿主細胞膜との融合過程において、極めて重要な役割を果たす糖タンパク質 glycoprotein 41 (gp41) で、第二ターゲットは分子シャペロンタンパク質 Cyclophilin A (CypA) である。申請者はこれら二つの蛋白質を対象に、*in silico* 手法

を用いた阻害剤探索を試みた。

申請者はまず HIV 膜融合阻害剤の開発を試みた。C-HR 様ペプチド C34 及びその改良体は 6HB の形成を阻害し、抗ウイルス活性を示すことが報告されている。しかし、これまでの取組みは特定の HIV gp41 の C-HR 配列に基づいたものであり、HIV 配列データベースのデータを活用したものではなかった。そこで、申請者は *in silico* によるより優れた人工ペプチドの創出を目標として、Los Alamos HIV 配列データベースから大量の配列を抽出し、様々な過程を経て 7 本のペプチド配列を抽出、実際の抗 HIV 活性を測定したところ、そのうち 3 本は野生型の C34 より強力なウイルス複製阻害効果を認めた。さらに、配列の改良を施した 11 本の新規ペプチドをデザインした。そのうちの 3 本は広範な抗 HIV スペクトルを有すると同時に、膜融合阻害剤 T-20 の耐性ウイルスにも有効であった。これまで、C-HR 模倣ペプチドの修飾は主に溶媒接触側残基中心に行われていたが、N-HR との相互作用面に位置する残基の修飾を行っても、ペプチドの活性増強に寄与する可能性があることを初めて本研究で示した。

引き続き、申請者は CypA をターゲットとする低分子化合物を見出すために、近年ドラッグデザインにおいてよく用いられる方法の一つである分子ドッキング法を用いて候補化合物の探索を行った。具体的には、CypA の表面にあるリガンド結合部位に市販化合物データベース中のリガンドを配置し、London dG というスコア関数を用いてそれらの親和性を評価した。1377 個からなる低分子化合物の商用データベースをドッキングした後、親和性が高いと評価された上位約 2% の 31 化合物を有力な阻害剤候補として選出した。ここから、市販の 29 化合物及びコントロール化合物 2 種について、抗 HIV 活性の測定を共同研究者に依頼した。その結果、2 種類の化合物はコントロール化合物と比べ、より強力な HIV 複製抑制活性を示した。また、これらの分子はウイルス増殖を 50% 阻害する濃度において、比較的低い細胞毒性を有することが確認できた。本研究で申請者が報告した 2 種の化合物は既存の CypA 阻害剤と異なる骨格を有するため、CypA 阻害剤の新たなリード化合物として今後期待できると考えられる。特に、その中の 1 つは強力な阻害活性を示すと同時に、既存の阻害剤と異なる結合様式を有するため、新系列の CypA 阻害剤開発に繋がる有用な情報を提示することができた。

以上のように申請者は、新たな抗 HIV 剤の可能性を有する化合物を見いだしただけでなく、結合様式や修飾様式に関して新たな知見を見いだしたので、博士(薬学)の学位を授与するのに相応しいものと認める。